

DialogWeb

Guided Search

new search

favorites

settings

order

cost

logout

help

Dynamic Search: Equivalent Patents/Families (File 352)

Records for: JP 6329551

save as alert...

save strategy only...

Output

Format: Full Record

Output as: Browser

display/send

Modify

refine search

back to picklist

select
all none

Records 1 of 1 In full Format

☐ 1. 7/19/1 DIALOG(R)File 352:Derwent WPI (c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

010019469 **Image available**

WPI Acc No: 1994-287181/199436

XRAM Acc No: C94-131014

Newly isolated tau-protein kinase I enzyme - with
specificity for tau-protein providing means for prevention and treatment
of Alzheimer's disease

Patent Assignee: TAKASHIMA A (TAKA-I); MITSUBISHI CHEM CORP (MITU);
MITSUBISHI KASEI CORP (MITU); HOSHINO T (HOSH-I); IMAHORI K (IMAH-I);
SAITO K (SAIT-I); SATO S (SATO-I); SHIRATSUCHI A (SHIR-I)

Inventor: HOSHINO T; IMAHORI K; SAITO K; SATO S; SHIRATSUCHI A; TAKASHIMA A

Number of Countries: 019 Number of Patents: 011

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 616032	A2	19940921	EP 94103057	A	19940301	199436 B
CA 2116460	A	19940903	CA 2116460	A	19940225	199441
JP 6253835	A	19940913	JP 9341160	A	19930302	199441
JP 6329551	A	19941129	JP 93191246	A	19930802	199507
EP 616032	A3	19961211	EP 94103057	A	19940301	199707
US 5837853	A	19981117	US 94204091	A	19940302	199902
			US 96602264	A	19960220	
US 6071694	A	20000606	US 94204091	A	19940302	200033
			US 95461018	A	19950605	
US 6248559	B1	20010619	US 94204091	A	19940302	200137
			US 95461018	A	19950605	
			US 98216958	A	19981221	
US 20020058637	A1	20020516	US 94204091	A	19940302	200237
			US 95461018	A	19950605	
			US 98216958	A	19981221	
			US 2001866712	A	20010530	
EP 616032	B1	20031112	EP 94103057	A	19940301	200380
DE 69433309	E	20031218	DE 633309	A	19940301	200407
			EP 94103057	A	19940301	

Priority Applications (No Type Date): JP 93191246 A 19930802; JP 9341160 A
19930302; JP 9385143 A 19930322

Cited Patents: 6. Jnl. Ref

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

EP 616032 A2 E 30 C12N-015/11

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL
PT SE

CA 2116460 A C12N-015/54

JP 6253835 A 13 C12N-009/12

JP 6329551 A 7 A61K-037/64

EP 616032 A3 C12N-015/11

US 5837853 A C07H-021/02

US 6071694 A C12Q-001/68

US 6248559 B1 C12N-015/12

Cont of application US 94204091

Div ex application US 94204091

CIP of application US 94204091

Div ex application US, 95461018

Div ex patent US 6071694

US 20020058637 A1 A61K-048/00 Div ex application US 94204091
 Div ex application US 95461018
 Div ex application US 98216958
 Div ex patent US 6071694
 Div ex patent US 6248559

EP 616032 B1 E C12N-015/11
 Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL
 PT SE

DE 69433309 E C12N-015/11 Based on patent EP 616032

Abstract (Basic): EP 616032 A

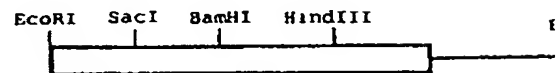
A preventive or therapeutic agent for Alzheimer's disease (AD) comprising a substance (I) which inhibits the activity of tau-protein kinase I (TPK-I) is claimed. (I) is pref. an antisense oligonucleotide capable of hybridising with mRNA or DNA of TPK-I. Also claimed are (1) compsns. contg. (I); (2) the use of (I) for the mfr. of a medicament for inhibiting neuronal cell death in the brain characterised by applicn. of (I) to the neurons in the brain; (3) a method for screening an agent useful for prevention or therapy of AD comprising incubating amyloid beta-protein, nerve cells and a putative agent and if death of the nerve cells occurs, deeming that agent to be effective; (4) human TPK-I (a 420 amino acid sequence is given in the specification); (5) recombinant TPK-I of human origin; and (6) a recombinant vector capable of expressing the TPK-I of (5).

USE - TPK-I specifically acts on tau-protein, which is thought to be involved in AD and senile dementia of the AD type. The characterisation of TPK-I may also lead to new agents for prevention and therapy.

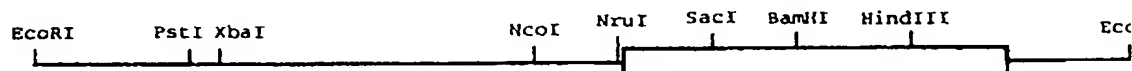
Dwg. 1/2

Human TPKI cDNA

Clone #1



Clone #2



Title Terms: NEW; ISOLATE; TAU; PROTEIN; KINASE; ENZYME; SPECIFIC; TAU;
 PROTEIN; PREVENT; TREAT; DISEASE

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): A61K-037/64; A61K-048/00; C07H-021/02;
 C12N-009/12; C12N-015/11; C12N-015/12; C12N-015/54; C12Q-001/68

International Patent Class (Additional): A61K-031/70; A61K-037/52;
 A61K-038/45; C07H-021/04; C12N-001/21; C12N-005/10; C12N-015/66;
 C12Q-001/02; C12Q-001/48; C12N-009/12; C12R-001-19; C12R-001-91

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-E01; B04-E08; B04-L04; B11-C08; B12-K04A5;
 D05-H12D2; D05-H12E; D05-H17A3; B04-E02E; B04-F0100E; B12-K04A

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M423 M710 M750 M781 M903 N102 P446 P616 P625 Q233 V753 V812
 02 M423 M430 M782 M903 N102 P831 Q233 V752 V754
 03 D011 D601 F012 F014 F423 F521 G010 G013 G100 H1 H100 H101 H181 H182
 H4 H401 H441 H481 H498 H5 H598 H8 H9 J0 J011 J012 J1 J111 J171 J172
 J3 J371 K0 L2 L250 M210 M211 M271 M280 M281 M311 M312 M313 M314 M315
 M320 M321 M331 M332 M333 M340 M342 M343 M349 M371 M381 M391 M423
 M510 M511 M520 M521 M530 M531 M540 M620 M710 M903 Q233 V802 V812
 V902 V917 V921

Chemical Fragment Codes (M6):

04 M903 P446 P625 P831 Q233 R515 R521 R627 R633

Derwent WPI (Dialog® File 352): (c) 2005 Thomson Derwent. All rights reserved.

©1997-2005 Dialog, a Thomson business - Version 2.5

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-329551

(43) 公開日 平成6年(1994)11月29日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 37/64	A A M	8314-4C		
C 1 2 N 15/11		9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数6 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平5-191246

(22) 出願日 平成5年(1993)8月2日

(31) 優先権主張番号 特願平5-85143

(32) 優先日 平5(1993)3月22日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000005968

三菱化成株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72) 発明者 高島 明彦

東京都町田市南大谷字11号916番地の2

株式会社三菱化成生命科学研究所内

(72) 発明者 星野 歳三

東京都町田市南大谷字11号916番地の2

株式会社三菱化成生命科学研究所内

(72) 発明者 今堀 和友

東京都町田市南大谷字11号916番地の2

株式会社三菱化成生命科学研究所内

(74) 代理人 弁理士 長谷川 曉司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルツハイマー病の予防または治療薬およびそのスクリーニング方法

(57) 【要約】

【構成】 タウプロテインキナーゼ I に対し阻害作用を有する物質を有効成分とするアルツハイマー病の予防または治療薬、タウプロテインキナーゼ I の DNA または mRNA とハイブリタイズ可能なアンチセンスオリゴヌクレオチドを有効成分とするアルツハイマー病の予防または治療薬、並びに、アルツハイマー病の予防または治療薬として有効であると推定される薬剤、神経細胞およびアミロイド β プロテインをインキュベートし、該神経細胞の細胞死が阻止されれば該薬剤がアルツハイマー病の予防または治療薬として有効であると判定する、アルツハイマー病の予防または治療薬のスクリーニング方法。

【効果】 本発明のアルツハイマー病の予防および治療薬によればアミロイド β プロテインによるタウプロテインキナーゼ I のリン酸化活性を抑制することにより、脳神経細胞死を阻止することができる。さらにその機構を利用してアルツハイマー病の予防又は治療薬のスクリーニングを行うことが可能である。

(2)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 タウプロテインキナーゼI に対し阻害作用を有する物質を有効成分とするアルツハイマー病の予防または治療薬。

【請求項2】 タウプロテインキナーゼI に対し阻害作用を有する物質が、該物質を神経細胞およびアミロイドβプロテインとともにインキュベートした際に、該神経細胞の細胞死を阻止する作用を有することを特徴とする請求項1記載のアルツハイマー病の予防または治療薬。

【請求項3】 タウプロテインキナーゼI のDNAまたはmRNAとハイブリタイズ可能なアンチセンスオリゴヌクレオチドを有効成分とするアルツハイマー病の予防または治療薬。

【請求項4】 アルツハイマー病の予防または治療薬として有効であると推定される薬剤、神経細胞およびアミロイドβプロテインをインキュベートし、該神経細胞の細胞死が阻止されれば該薬剤がアルツハイマー病の予防または治療薬として有効であると判定する、アルツハイマー病の予防または治療薬のスクリーニング方法。

【請求項5】 脳神経細胞にタウプロテインキナーゼI に対し阻害作用を有する物質を作用させることを特徴とする脳神経細胞死を阻止する方法。

【請求項6】 脳神経細胞にタウプロテインキナーゼI のDNAまたはmRNAとハイブリタイズ可能なアンチセンスオリゴヌクレオチドを作用させることを特徴とする脳神経細胞死を阻止する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はアルツハイマー病の予防または治療薬およびそのスクリーニング方法に存し、詳しくはタウプロテインキナーゼI 阻害剤を用いたアルツハイマー病の予防または治療薬およびアミロイドβプロテインを利用したアルツハイマー病の予防または治療薬のスクリーニング方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 アルツハイマー病は初老期(45~65才)に発病する進行性の痴呆で、病的な変化として神経細胞の変質及び神経細胞数の減少による大脳皮質の萎縮が認められ、また病理学的には、脳内に多数の老人斑と神経原線維変化が認められる。65才以上の老年期に発症する自然老化による老年痴呆も、病理学的に何等本質的差は認められないのでアルツハイマー型老年痴呆と呼ばれている。この疾患の患者数は、高齢者人口の増加と共に増大し社会的に重要な疾患となっている。しかし、この疾患の原因については諸説あるものの結果的には未だ不明であり早期の解明が望まれている。

【0003】 アルツハイマー病及びアルツハイマー型老年痴呆に特徴的な二つの病理変化の出現量は、知能障害の程度とよく相関することが知られている。そこで、この二つの病理変化を生ずる不溶性の蓄積物質を分子レベ

2

ルで解明し、この疾患の病因に到達しようとする研究が1980年代の前半頃から行われてきた。

【0004】 この病理変化の一つである老人斑の主要成分がアミロイドβプロテイン(以下「AβP」と略することもある)であることが解明されている[Annu. Rev. Neurosci. 12, 463-490(1989)]。また、もう一つの病理変化である神経原線維変化は、神経細胞内にPHF(ペアー・ヘリカル・フィラメント: paired helical filament)と呼ばれる二重らせん状の繊維状物質が蓄積してくるものであり、近年、その構成成分として脳に特異的な微小管付随蛋白質の一種であるタウ蛋白質とユビキチンとが同定されている[J. Biochem., 99, 1807-1810(1986); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 4913-4917(1986)]。

【0005】 そして、アルツハイマー病は、脳神経細胞内にアミロイドβプロテインが異常に蓄積し、これがPHFの形成と連繋して神経細胞の死を招くものと考えられている。タウ蛋白質は、通常SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量48~65 kd)に数本のバンドを形成する一群の近縁蛋白質であり微小管の形成を推進する。アルツハイマー病脳のPHF中に組み込まれたタウ蛋白質は、通常のタウ蛋白質よりも異常にリン酸化されていることが、PHFに対するポリクローナル抗体[抗ptau: J. Biochem., 99, 1807-1810(1986)]や、タウ蛋白質に対するモノクローナル抗体[tau-1抗体: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 4913-4917(1986)]を用いて証明されている。

【0006】 この異常なリン酸化を触媒する酵素が単離され、タウプロテインキナーゼI(以下「TPKI」と略記することもある)と命名され、その理化学的性質が解明されている[生化学, 第64巻, 第5号, 308頁, (1992)]。更に、TPKIの部分アミノ酸配列に基づいてラット大脳皮質cDNAライブラリーからラットTPKIのcDNAがクローニングされ、その塩基配列が決定されると共にアミノ酸配列が推定された(特願平4-177241号)。その結果、このラットTPKIの一次構造がラットGSK-3β(グリコーゲン・シンターゼ・キナーゼ 3β)として知られる酵素の一次構造と一致することが確認されている[EMBO J., 9, 2431-2438(1990)]。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、アルツハイマー病の脳に特異的に見られる、アミロイドβプロテイン及びPHFの蓄積と神経細胞死との関連を解明し、アルツハイマー病因の解明、更には、これを予防又は治療する薬物の探索への応用を意図するものである。

【0008】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は上記の目標を達成するため検討中のところ、脳神経細胞にアミロイドβプロテインを作用させると、TPKIの活性が著るしく増大してアルツハイマー病脳のPHF中に認められる異常にリン酸化されたタウ蛋白質が表われ、また神経細胞が死滅すること、並びに上記TPKI活性の増大及

(3)

3

び脳神経細胞の死滅はTPK Iのアンチセンスオリゴヌクレオチドを作用させることによって抑制されることを確認した。

【0009】本発明は上記の知見に基づいて更に検討を重ねた結果達成されたものであり、その要旨は、タウプロテインキナーゼIに対し阻害作用を有する物質を有効成分とするアルツハイマー病の予防または治療薬、タウプロテインキナーゼIのDNAまたはmRNAとハイブリタイズ可能なアンチセンスオリゴヌクレオチドを有効成分とするアルツハイマー病の予防または治療薬、および、アルツハイマー病の予防または治療薬として有効であると推定される薬剤、神経細胞およびアミロイドβプロテインをインキュベートし、該神経細胞の細胞死が阻止されれば該薬剤がアルツハイマー病の予防または治療薬として有効であると判定する、アルツハイマー病の予防または治療薬のスクリーニング方法に存する。

【0010】以下、本発明を詳細に説明する。本発明においてタウプロテインキナーゼI（以下「TPK I」と略記することもある）に対し阻害作用を有する物質としては、該物質を神経細胞およびアミロイドβプロテインとともにインキュベートした際に、該神経細胞の細胞死を阻止する作用を有する物質であれば良く、化学的に合成された物質、微生物の菌体から抽出された物質等が挙げられる。また、本発明においてはTPK IのDNAまたはmRNAとハイブリタイズ可能なアンチセンスオリゴヌクレオチド（以下「TPK Iアンチセンスオリゴヌクレオチド」と略記することもある）をアルツハイマー病の予防または治療に使用する。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、蛋白質合成を遺伝子レベルで抑制できるため、近年、病因となる蛋白質の合成阻害剤として医療分野で注目されている。その原理は、アンチセンスRNA又はアンチセンスDNAがセンス配列のmRNAと塩基対を形成することにより遺伝情報の流れを遮断し、最終産物である蛋白質の合成を阻害することにある[医学のあゆみ、Vol. 162, No. 13, 909-911 (1992)]。

【0011】本法に適用されるTPK IアンチセンスオリゴヌクレオチドとしてはTPK IのDNAまたはmRNAとハイブリタイズ可能であって、転写の阻害、pre-mRNAのスプライシングの阻害、mRNA核膜透過の阻害、翻訳の阻害等によりTPK Iの合成を阻害する配列を有するものであればよく、通常15~30個程度のものが用いられる。具体的には、例えば、前記のEMBO J., 9, 2431-2438 (1990)に記載されているラットGSK-3βの一次構造(TPK Iの一次構造と同一)におけるTPK Iの翻訳開始領域の最初の6アミノ酸残基:Met Ser Gly Arg Pro Argに対応するTPK Iセンスオリゴヌクレオチド鎖:5'-ATGTCGGGGCGACCGAGA-3' (配列表の配列番号2)と相補的なTPK Iアンチセンスオリゴヌクレオチド鎖:5'-TCTCGGTCGCCCGACAT-3' (配列

4

表の配列番号3)や特願平5-41160号(平成5年3月2日出願)に記載されているヒトTPK Iの一次構造におけるTPK Iの翻訳開始領域の最初の6アミノ酸残基:Met Ser Gly Arg Pro Argに対応するTPK Iセンスオリゴヌクレオチド鎖:5'-ATGTCAGGGCGGCC'CAGA-3' (配列表の配列番号4)と相補的なTPK Iアンチセンスオリゴヌクレオチド鎖:5'-TCTGGGCGCCCTGACAT-3' (配列表の配列番号5)等が用いられる。

【0012】上記のTPK Iセンスオリゴヌクレオチド及びTPK Iアンチセンスオリゴヌクレオチドは市販の自動DNA合成機を用いて容易に合成することができる。なお、本発明のTPK Iアンチセンスオリゴヌクレオチドは前述したようにTPK IのDNAまたはmRNAとハイブリタイズ可能であれば上記の配列のみに特に制限はされず、ハイブリッド形成能を損なわない範囲において一部の配列を任意の塩基に置換しても差し支えない。また、Science, 259, 373-377 (1993)に記載の、血液脳関門を通過するような改変または修飾を施したアンチセンスオリゴヌクレオチドも本発明の範囲に含まれる。

【0013】上記のTPK Iに対し阻害作用を有する物質またはTPK Iアンチセンスオリゴヌクレオチドをアルツハイマー病の予防または治療薬として用いる場合、通常の担体とともに投与経路に応じた製剤とする事が出来る。例えば、経口投与では錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、液剤等の形態に調剤される。経口投与用固形製剤に調製するに当たり、慣用の賦形剤、結合剤、滑沢剤、その他着色剤、崩壊剤等を用いることができる。賦形剤としては、例えば、乳糖、デンプン、タルク、ステアリン酸マグネシウム、結晶セルロース、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、グリセリン、アルギン酸ナトリウム、アラビアゴム等が挙げられ、結合剤としてはポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、エチルセルロース、アラビアゴム、シエラック、白糖等が挙げられ、滑沢剤としてはステアリン酸マグネシウム、タルク等が挙げられる。その他、着色剤、崩壊剤も通常公知のものを用いることができる。なお錠剤は周知の方法によりコーティングしてもよい。また液状製剤は水性または油性の懸濁液、溶液、シロップ、エリキシル剤、その他であってよく、通常用いられる方法にて調製される。注射剤を調製する場合は本発明化合物にpH調整剤、緩衝剤、安定化剤、等張剤、局所麻酔剤等を添加し、常法により皮下、筋肉内、静脈内用注射剤を製造することができる。坐剤を製造する際の基剤としては、例えばカカオ脂、ポリエチレングリコール、ウイテプゾール(登録商標ダイナマイトノーベル社)等の油脂性基剤を用いることができる。

【0014】かくして調製される製剤の投与量は患者の

(4)

5

症状、体重、年齢等によって異なり、一様に決定することは出来ないが、通常成人1日当たり本発明化合物を約1-1000mgの範囲となる量とするのがよく、これは通常1日1-4回に分けて投与されるのが好ましい。また場合により、投与は1回/1日~数日あるいはそれ以上の間隔で投与することも可能である。本発明で使用する神経細胞としては、哺乳動物から採取した脳神経細胞の他、脳神経細胞のセルラインに対し、NGF（神経成長・栄養因子）、IGF（インシュリン様成長因子）等の成長因子で誘導をかけて神経突起を伸展させたものが挙げられる。前者としては、哺乳動物、例えばラットの海馬の組織を摘出し、完全培地中で培養した培養液が用いられる。後者としては、NGF、FGF（繊維芽細胞因子）、EGF（上皮細胞成長因子）、インターロイキン 6等で誘導をかけたPC12細胞（Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 31, 205-228(1991)）、IGFで誘導をかけたSH-SY5Y細胞（The Journal of Cell Biology, 102, 1949-1954(1986)）のほか、Cell Culture in the Neurosciences, New York:Plenum Press, p95-123(1985)に記載の、NGFで誘導をかけたMJB細胞、NMB細胞、NGP細胞、SK-N-SH-SY5Y細胞、LAN-1細胞、KA-9細胞、IMR-32細胞、5-プロモデオキシウリジンで誘導をかけたIMR-32細胞、NMB細胞、NGP細胞等が挙げられる。アミロイドβプロテインは、アルツハイマー病の老人斑の主要成分であって、下記43個のアミノ酸残基のペプチドから構成されることが知られている[Science250, 279-282(1990)及びProc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 9020-9023(1990)]。

【0015】アミロイドβプロテインのアミノ酸配列（配列表の配列番号1）：Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr

【0016】以下、本発明の一例として、ラット海馬細胞を用い、これに所定量のアミロイドβプロテイン（以下「AβP」と略記する）、比較対照物質としてのTPKIセンスオリゴヌクレオチド（以下「TPKI-センス」と略記する）及びTPKIアンチセンスオリゴヌクレオチド（以下「TPKI-アンチセンス」と略記する）を所定の条件下で作用させた場合における海馬細胞の挙動並びにTPKIのリン酸化活性について、更に詳細に説明する。本発明をアルツハイマー病の予防および治療薬のスクリーニング方法として実施する場合は、神経細胞としてラット海馬細胞を使用し、アルツハイマー病の予防または治療薬であると推定される薬剤としてTPKI-センスまたはTPKI-アンチセンスを使用する。

6

【0017】海馬細胞の培養液に、所定量のTPKI-アンチセンスを所定温度で加え、次いで所定量のAβPを添加して所定の温度に保持し、時間の経過に伴う生存細胞数を後記実施例に示す方法により測定した。比較のため、AβPのみを添加して同様に処理した場合、及びTPKI-センスとAβPとを添加して同様に処理した場合について生存細胞数を測定した。その結果、TPKI-アンチセンスとAβPを添加した場合の生存細胞数は、後記実施例に示すように、AβPのみを添加した場合及びTPKI-センスとAβPを添加した場合の生存細胞数に比較して著しく大きく、TPKI-アンチセンスがAβPによる細胞死を阻止する作用を有することを示した。

【0018】また、細胞培養液に、TPKI-アンチセンスとAβPを添加して24時間保持した場合、AβPのみを添加して同時間保持した場合、並びにTPKI-センスとAβPを添加して同時間保持した場合の試料の位相差顕微鏡（倍率：400倍）による観察結果では、TPKI-アンチセンスを作用させた場合のみがAβPによる細胞毒性が少なくコントロールに近似していることが判明した。

【0019】更に細胞培養液に、上記と同様にAβPのみを添加して保持した場合、及びTPKI-アンチセンスとAβPを添加して保持した場合について、24時間後のTPKIによるタウ蛋白質のリン酸化活性を、後記実施例に示す方法により測定した。その結果、TPKI-アンチセンスとAβPを添加した場合におけるTPKIのリン酸化活性は、後記実施例に示すように、AβPのみを添加した場合のリン酸化活性の約半分であり、TPKI-アンチセンスが、TPKIのリン酸化活性を抑制する作用を有することを示した。以上の結果より、本発明をアルツハイマー病の予防および治療薬のスクリーニング方法として実施する場合は、TPKI-アンチセンスは該予防および治療薬として有効であると判定することができる。なお、TPKIアンチセンスオリゴヌクレオチド以外の薬剤の有効性も同様にして判定できる。

【0020】

【実施例】以下に本発明を実施例について説明するが、本発明はその要旨を超えない限り以下の実施例に限られるものではない。なお、本実施例における細胞毒性の判定、タウ蛋白質のリン酸化の測定、並びにA1z-50抗体による免疫組織化学は以下の方法により実施した。また、以下の実施例は何れも別個に少なくとも3回の実験を行ない、データはそれらの平均値を示した。

【0021】細胞毒性の判定：多くの正常で健康な細胞の数は、位相差顕微鏡により、処理後の生存細胞の指標としてカウントした。正常な細胞は、形態学的に平滑な輪郭及び多数の神経細胞突起をもつ細胞を有するものとした。一方、変成した細胞は、不規則な形状、神経突起の変成等により判定した。なお、生存細胞数はウエル中

(5)

7

で数えた。標準培養液ではウエル当たり400以上の細胞数であった。この結果を免疫組織化学的手法により確認した。

【0022】タウ蛋白質のリン酸化測定：海馬細胞は氷冷したリン酸塩緩衝液で3回洗浄して培地から採取した。細胞を、ホスファターゼ阻害剤(1 mM オカダ酸、生化学工業社製)、プロテアーゼ阻害剤(1 mMのフェニルメチルスルホニルフロライド及び各1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のロイペプチン、ペプスタチン、アプロチニン)を含有する20 mMの2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸、0.5 mMの酢酸マグネシウム及び1 mMのEGTAを含有するpH 6.8の緩衝液A中に懸濁してホモジナイズし14000 gで1時間遠心し、上清をリン酸化の検定に用いた。

【0023】遺伝子組換えによりE. coli BL21中で発現させたラットタウ蛋白質をJ. Biol. Chem. 267, 10897-10901 (1992)に記載の方法により精製した。1 μl の海馬細胞抽出物を、1 mMの[γ - ^{32}P]ATP(10-20 Ci/mmol)を含む緩衝液Aに溶解したラットタウ蛋白質(400 $\mu\text{g}/\text{ml}$)の溶液に添加し、これに10 μM のオカダ酸を加えて最終的に10 μl とした。37℃で3時間インキュベートした後、電気泳動用緩衝液を加えて反応を停止した。10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、タウ蛋白質中の ^{32}P をレーザーイメージ分析機(Fuji BAS 2000)で観察した。

【0024】A1z-50抗体による免疫組織化学：海馬細胞の培養液をリン酸塩緩衝液中で4%パラホルムアルデヒドにより10分間固定した。固定した培養液を0.2%トリトンX-100を含むトリス緩衝塩液中で30分間インキュベートして細胞を浸透し易くした。次いで、この培養液を1:5に希釈したA1z-50マウスモノクローナル一次抗体、ベクタステイン(Vectastain)ABCアビジン-ビオチン-過酸化酵素検出キット(ベクターラボラトリー社製)を用い、色素としてジアミノベンジジンテトラヒドロクロライドを用いて免疫標識した。

【0025】実施例1

細胞培養液の調製：ラットの海馬胚の初期培養液をBrain Res. 126, 397-425(1977)に記載の方法に準じて調製した。即ち、受精後18日のラット胚から海馬組織を採取し、パバイン(プロテアーゼ)10 U/ml中において37℃で20分間消化した。得られた細胞を、ダルベッコ修飾イー

8

グル媒地に、5%牛胎児血清、5%馬血清、インシュリン10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、トランスフェリン0.1 mg/ml、アプロティニン1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、ビルビン酸ナトリウム1 mM及びゲンタマイシン84 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を補足した媒地中に加えた。これをポリ-L-リジンで被覆した組織培養ウエルに、 2×10^5 セル/cm²の密度で播いて3日間培養し、次いで1 μM のシトシン- β -アラビノフラノサイドで24時間処理して培養5日目の細胞を使用した。

【0026】A β Pの調製：Science 250, 279-282(1990)及びProc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 9020-9023(1990)に記載の方法により、前記43個のアミノ酸残基からなるA β Pペプチドを合成し、精製した後、35%アセトニトリルに溶解して2 mMの貯蔵溶液を調製した。

【0027】TPK I-センス及びTPK I-アンチセンスの調製：ラットGSK-3 β [EMBO J., 9, 2431-2438 (1990)]の一次構造の翻訳開始領域に対応する下記18塩基のTPK I-センス及びこれと相補的なTPK I-アンチセンスを自動DNA合成機(MilliGen)を用いて合成し、20%アクリルアミド-尿素ゲルから回収してエタノール沈澱法により精製し、沈澱物を水に溶解して1 μM の濃度に調整した。

TPK I-センス : 5'-ATGTCGGGGC
GACCGAGA-3'

TPK I-アンチセンス : 5'-TCTCGGTTCG
CCCCACAT-3'

【0028】脳神経細胞死の阻止作用：前記方法で調製した海馬細胞の培養液を用いて以下に示す(b)~(d)の処理を行ない、時間の経過に伴う生存細胞数を数え、その結果を表1に示した。

(a) 無処理培養液(コントロール)。

(b) 細胞培養液1 mlに1 μM のTPK I-アンチセンスを加え5分後、20 μM のA β Pを添加して37℃で24時間保持した。

(c) 細胞培養液1 mlに20 μM のA β Pを加えて37℃で24時間保持した。

(d) 細胞培養液1 mlに1 μM のTPK I-センスを加え5分後、20 μM のA β Pを添加し37℃で24時間保持した。

【0029】

【表1】

処 理 剤	生 存 細 胞 数 (%)	
	6時間後	21時間後
コントロール	100	100
A β P+TPK I-アンチセンス	83.0	72.6
A β P	41.3	25.4
A β P+TPK I-センス	49.5	17.1

(6)

9

【0030】表1は、上記の(b)、(c)及び(d)の処理の時間経過に伴う生存細胞数を示し、生存細胞数はコントロールに対する百分率(%)で表わした。表1に示されるように、海馬細胞にTPK I-アンチセンス及びAβPを作用させた場合(b)の6時間及び21時間経過後の生存細胞数は、AβPのみを作用させた場合(c)及びTPK I-センスとAβPとを作用させた場合(d)の生存細胞数を遙かに凌駕した。この事実は、TPK I-アンチセンスが、AβPによる細胞死を著しく阻止する作用を有することを明瞭に示している。また、上記(b)～(d)の37℃、24時間経過後の位相差顕微鏡(倍率:400倍)観察では、海馬細胞にTPK I-アンチセンス及びAβPを作用させた場合(b)のみがAβPによる細胞毒性が少なくコントロールに近似することが判明した。

【0031】タウ蛋白質のリン酸化:

①無処理細胞培養液(コントロール)、②細胞培養液1 mlに1μMのTPK I-アンチセンスを加え5分後に20μMのAβPを添加した試料、及び③細胞培養液1 mlに20μMのAβPを加えた試料について、前記の方法によりTPK Iのリン酸化活性を測定し、その結果を表2に示した。なお、表2におけるTPK Iのリン酸化活性は、上清中の蛋白質1 mg当りのリン酸化活性(単位/mg 蛋白質)を表わし、一単位はレーザーイメージ分析機(BAS 2000, Fuji)により測定した放射能の強度と等価である。

【0032】

【表2】

処 理 剤	TPK Iのリン酸化活性 (単位/mg 蛋白質)
コントロール	39.6
AβP+TPK I-アンチセンス	31.6
AβP	66.2

配列

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln
 1 5 10 15
 Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala
 20 25 30
 Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr
 35 40

【0036】配列番号: 2

配列の長さ: 18

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列

ATGTCGGGGC GACCGAGA 18

【0037】配列番号: 3

10

【0033】表2に示すように、細胞培養液にTPK I-アンチセンス及びAβPを作用させた場合②のTPK Iのリン酸化活性は、AβPのみを作用させた場合③のリン酸化活性の約半分であり、TPK I-アンチセンスが、AβPによるTPK Iのリン酸化活性を大幅に抑制することが明らかである。

【0034】

【発明の効果】本発明のアルツハイマー病の予防および治療薬によればアミロイドβプロテインによるタウプロテインキナーゼIのリン酸化活性を抑制することにより、脳神経細胞死を阻止することができる。さらにその機構を利用してアルツハイマー病の予防又は治療薬のスクリーニングを行うことが可能である。

【0035】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 43

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

20 配列の種類: ペプチド

配列の長さ: 18

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

アンチセンス: Yes

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列

TCTCGGTCGC CCCGACAT 18

50 【0038】配列番号: 4

(7)

11

配列の長さ：18
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成DNA
配列
ATGTCAGGGC GGCCAGA 18
【0039】配列番号：5

12

配列の長さ：18
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
アンチセンス：Yes
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成DNA
配列
TCTGGGCCGC CCTGACAT 18

【手続補正書】

【提出日】平成6年6月21日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

【補正内容】

【0024】A1z-50抗体による免疫組織化学：海馬細胞の培養液をリン酸塩緩衝液中で4%パラホルムアルデヒドにより10分間固定した。固定した培養液を0.2

%トリトンX-100を含むトリス緩衝塩液中で30分間インキュベートして細胞を浸透し易くした。次いで、この培養液を1:5に希釈したA1z-50マウスモノクローナル一次抗体 (Science, 232, 648-650 (1986))、ベクタステイン (Vectastain) ABC アビジン-ビオチン-過酸化酵素検出キット (ベクターラボラトリー社製) を用い、色素としてジアミノベンジジンテトラヒドロクロライドを用いて免疫標識した。

フロントページの続き

(72) 発明者 斎藤 健一
神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三
菱化成株式会社総合研究所内